

多指标成分定量控制联合化学计量学、熵权优劣解距离法的复方牙痛酊综合质量评价

华 阳¹, 刘海平², 李志明³

1. 海安市人民医院药剂科 (江苏海安 226600)
2. 常州市第七人民医院药事科 (江苏常州 213011)
3. 南京中医药大学药学院 (南京 210023)

【摘要】目的 采用 HPLC 法检测复方牙痛酊中 10 种成分含量, 并联合化学计量学及熵权优劣解距离法对复方牙痛酊质量进行综合评价。**方法** 以 Diamonsil C₁₈ 柱为色谱柱, 乙腈-0.4% 磷酸为流动相, 同时测定 15 批复方牙痛酊中缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二酯、指甲花醌、指甲花甲醚的含量, 采用统计学软件对 15 批样品进行差异分析。**结果** 10 种成分分别在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9991$), 平均加样回收率范围 96.93%~100.12% ($RSD \leq 1.50\%$, $n=9$); 化学计量学分析显示 15 批样品聚为 3 类; 羟基红花黄色素 A、指甲花醌、缬草三酯、红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷是影响复方牙痛酊产品质量的主要潜在标志物; 熵权优劣解距离法可评判复方牙痛酊的质量优劣。**结论** 所建立的 HPLC 多指标成分定量控制联合化学计量学、熵权优劣解距离法可用于复方牙痛酊质量的综合评价。

【关键词】 复方牙痛酊; 高效液相色谱法; 化学计量学; 熵权优劣解距离法

Comprehensive quality evaluation of compound Yatong tincture based on HPLC multi-index quantitative determination combined with chemometrics and EW-TOPSIS method

Yang HUA¹, Hai-Ping LIU², Zhi-Ming LI³

1. Department of Pharmacy, The People's Hospital of Haian, Haian 226600, Jiangsu Province, China

2. Department of Pharmaceutical Affairs, Changzhou No.7 People's Hospital, Changzhou 213011, Jiangsu Province, China

3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Corresponding author: Yang HUA, Email: pdqk08@163.com

【Abstract】Objective HPLC method was used to detect the contents of 10 components in compound Yatong tincture, and the quality of compound Yatong tincture was comprehensively evaluated by chemometrics and entropy weight technique for order preference by similarity to ideal solution (EW-TOPSIS). **Methods** Diamonsil C₁₈ column was used as

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202308008

基金项目: 江苏省中医药科技发展计划面上项目 (MS2021008)

通信作者: 华阳, 硕士, 主管药师, Email: pdqk08@163.com

<https://ywlxwb.whuzhmedj.com/>

the chromatographic column and acetonitrile-0.4% phosphoric acid as the mobile phase. The contents of valtrate, acevaltrate, hydroxysafflor yellow A, 6-hydroxykaempferol-3, 6-dioxy diglucoside, 6-hydroxykaempferol-3-*O*- β -rutinoside-6-*O*- β -glucoside, 6-hydroxykaempferol 3-*O*- β -glucoside, safflor yellow A, saffrole glycol, lawsone, lawsone methyl ether in 15 batches of compound Yatong tincture were determined. The differences of 15 batches of samples were analyzed by statistical software. **Results** The 10 components had good linear relationships within their respective ranges ($r \geq 0.999$), and the average recovery rate was 96.93%-100.12% ($RSD \leq 1.50\%$, $n=9$). Chemometrics analysis showed that 15 batches of samples were clustered into 3 groups. Hydroxysafflor yellow A, lawsone, valtrate, safflor yellow A, 6-hydroxykaempferol-3-*O*- β -rutinoside-6-*O*- β -glucoside were the main potential markers affecting the quality of compound Yatong tincture. The EW-TOPSIS method can be used to evaluate the quality of compound Yatong tincture. **Conclusion** The HPLC multi-index quantitative determination combined with chemometrics and EW-TOPSIS method can be used for the comprehensive evaluation of the quality of compound Yatong tincture.

【Keywords】 Compound Yatong tincture; HPLC; Chemometrics; EW-TOPSIS

复方牙痛酊由宽叶缬草、红花、鲜凤仙花和鲜樟木组方而成,具有活血散瘀、消肿止痛的作用,临床主要用于治疗牙龈炎、龋齿引起的牙痛或牙龈肿痛^[1]。该药现行质量标准及相关文献^[2]仅以鲜樟木中的1~2种成分为指标进行含量测定,因溶剂中含有少量甲醇,也有文献^[3]对甲醇的残留量进行了规定,但均未涉及到组方中的其他3味药材,不能保证制剂的整体质量。为更好地控制复方牙痛酊的质量,保证其药效,本试验根据中医配伍理论,以君药宽叶缬草药效成分缬草三酯和乙酰缬草三酯为首选,兼顾红花活性成分羟基红花黄色素A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-*O*- β -芸香糖苷-6-*O*- β -葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-*O*- β -葡萄糖苷和红花黄色素A,鲜凤仙花特征成分指甲花醌和指甲花甲醚,以及鲜樟木代表性成分黄樟素乙二醇,采用HPLC法同时测定15批复方牙痛酊中上述10种成分的含量,并联合化学计量学及熵权优劣解距离法(EW-TOPSIS)对其进行综合质量评价^[4-6],旨在为复方牙痛酊的整体质量控制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Arc型HPLC仪(美国Waters公司); Agilent 1100型HPLC仪(美国安捷伦科技有限公司); MS205DU型电子天平(瑞士Mettler toledo公司)。

1.2 试药

对照品羟基红花黄色素A(中国食品药品检定研究院,批号:111637-202111,含量96.8%);缬草三酯、红花黄色素A、指甲花醌和乙酰缬草三酯(成都普瑞法科技开发有限公司,批号依次为PRF22010601、PRF8101143、PRF9042426和PRF22011101,含量均高于97.1%);6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-*O*- β -芸香糖苷-6-*O*- β -葡萄糖苷和6-羟基山萘酚-3-*O*- β -葡萄糖苷(批号均为CFS202101,含量均高于98.0%)、黄樟素乙二醇和指甲花甲醚(批号分别为CFS201701和CFS201901,含量均高于98.0%),这5个对照品均源于武汉天植生物技术有限公司。乙腈和磷酸(色谱纯,美国Fisher公司),甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),试剂用水为超纯水。编号为S1~S15的复方牙痛酊[国药集团同济堂(贵州)制药有限公司,批号:200901、200912、201002、201011、201103、201105、210107、210310、210602、211004、220301、220303、220308、220404、220501,规格:10 mL/瓶]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m)柱,柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 0~17 min在

256 nm 检测缬草三酯和乙酰缬草三酯^[7-11], 17~36 min 在 375 nm 检测羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷和 6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A^[12-16], 36~65 min 在 280 nm 检测黄樟素乙二醇、指甲花醌和指甲花甲醚^[17-19]; 流动相为 0.4% 磷酸-乙腈 (A)^[9,15], 梯度洗脱 (0~10 min, 13.0%A; 10~17 min, 13.0% → 20.0%A; 17~36 min, 20.0% → 25.0%A; 36~43 min, 25.0% → 28.0%A; 43~59 min, 28.0% → 38.0%A; 59~65 min, 38.0% → 13.0%A), 洗脱时间为 65 min, 流速为 1.0 mL · min⁻¹; 进样量为 10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液

取缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚对照品适量, 用 70% 甲醇制成质量浓度分别为

0.398 0, 0.214 0, 1.970 0, 0.192 0, 0.548 0, 0.312 0, 1.210 0, 0.108 0, 0.670 0, 0.596 0 mg · mL⁻¹ 的混合对照品母液, 再同一溶剂将该母液稀释 20 倍得混合对照品溶液 (上述 10 种对照品质量浓度分别为 19.90, 10.70, 98.50, 9.60, 27.40, 15.60, 60.50, 5.40, 33.50, 29.80 μg · mL⁻¹)。

2.2.2 供试品溶液

精密吸取复方牙痛酊 5 mL, 70% 甲醇定容至 25 mL, 摇匀, 过滤, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液

按质量标准分别制备缺宽叶缬草、缺红花、缺鲜樟木和缺鲜凤仙花的阴性样品, 再按“2.2.2”项下方法制成 4 个阴性样品溶液。

2.3 系统适用性试验

分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 10 μL, 按“2.1”项色谱条件测定, 记录色谱曲线。图谱显示供试品溶液中 10 种成分与相邻色谱峰的分度均 ≥ 1.5, 供试品溶液的色谱曲线有与对照品溶液色谱图保留时间一致的色谱峰, 阴性样品则无; 理论板数按羟基红花黄色素 A 计应不低于 5 500, 见图 1。

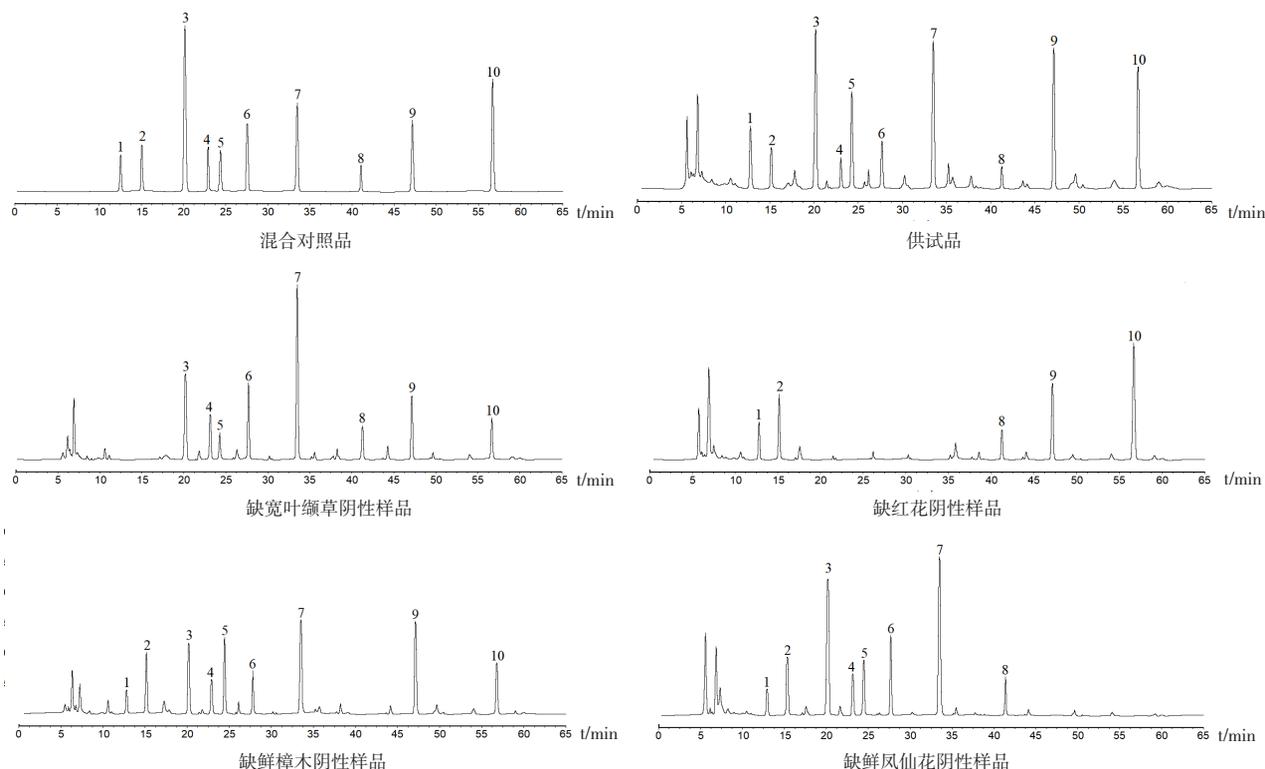


图1 HPLC色谱图

Figure 1. HPLC chromatograms

注: 1. 缬草三酯; 2. 乙酰缬草三酯; 3. 羟基红花黄色素 A; 4. 6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷; 5. 6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷; 6. 6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷; 7. 红花黄色素 A; 8. 黄樟素乙二醇; 9. 指甲花醌; 10. 指甲花甲醚

2.4 多指标成分定量检测

2.4.1 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品母液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL, 用溶剂定容成 6 个质量浓度的线性工作溶液 (1~6), 按“2.1”项色谱条件测定峰面积, 以缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-

双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚对照品质量浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横轴, 峰面积为纵轴 (Y) 进行线性回归, 得缬草三酯等 10 个成分的回归方程和线性范围, 结果见表 1。

表1 10个成分的线性关系与范围

Table 1. Linearity and ranges of 10 components

成分	回归方程	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数 (r)
缬草三酯	$Y=1.8627 \times 10^6 X - 1218.8$	1.99~99.50	0.999 1
乙酰缬草三酯	$Y=1.2403 \times 10^6 X + 754.6$	1.07~53.50	0.999 5
羟基红花黄色素A	$Y=1.7600 \times 10^6 X - 970.4$	9.85~492.50	0.999 5
6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷	$Y=9.1352 \times 10^5 X + 1256.7$	0.96~48.00	0.999 7
6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷	$Y=2.3124 \times 10^6 X + 285.2$	2.74~137.00	0.999 4
6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷	$Y=1.6373 \times 10^6 X - 835.3$	1.56~78.00	0.999 6
红花黄色素A	$Y=2.0901 \times 10^6 X + 1386.2$	6.05~302.50	0.999 4
黄樟素乙二醇	$Y=6.8085 \times 10^5 X - 786.5$	0.54~27.00	0.999 1
指甲花醌	$Y=2.9824 \times 10^6 X + 1206.6$	3.35~167.50	0.999 2
指甲花甲醚	$Y=2.6387 \times 10^6 X + 592.2$	2.98~149.00	0.999 4

2.4.2 精密度、稳定性及重复性试验

精密吸取复方牙痛酊 (编号: S1) 供试品溶液 10 μL , 在上述色谱条件下进样检测 6 次, 测定缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚色谱曲线峰面积, 得曲线峰面积的 RSD 依次为 1.28%, 1.32%, 0.83%, 1.40%, 1.19%, 1.25%, 1.01%, 1.53%, 1.13%, 1.20%, 均小于 2.0% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

取一份复方牙痛酊 (编号: S1) 供试品溶液, 于制备后 0, 2, 4, 7, 12, 18, 24 h 进样, 记录缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚色谱曲线峰面积, 得曲线峰面积的 RSD 依次为 1.30%, 1.29%, 0.77%, 1.38%, 1.20%, 1.22%, 1.03%, 1.56%, 1.11%, 1.18%, 均小于 2.0% ($n=7$), 表明复方牙痛酊供试品溶液 24 h 内是稳定的。

取 6 份复方牙痛酊 (编号: S1), 各自按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 在上述色谱条件下测定色谱曲线, 用外标法计算缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚的含量, 得各成分含量的平均值分别为 0.125, 0.066, 0.509, 0.059, 0.172, 0.089, 0.378, 0.030, 0.216, 0.186 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含量的 RSD 依次为 1.51%, 1.79%, 1.30%, 1.61%, 1.34%, 1.78%, 1.26%, 1.86%, 1.43%, 1.55%, 均小于 2.0% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

2.4.3 加样回收率试验

分别吸取 9 份已知各成分含量的复方牙痛酊 (S1) 2.5 mL, 每 3 份为一组, 作为低、中、高浓度组, 分别加入混合对照品溶液 (缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚对照品质量浓度分

别为 0.321, 0.157, 1.285, 0.141, 0.427, 0.231, 0.934, 0.079, 0.547, 0.453 mg · mL⁻¹) 0.8, 1.0, 1.2 mL, 照“2.2.2”项下制成加样供试品溶液并按照各组分拣对照品外标法进行测定, 得 10 种成分平均加样回收率分别为 98.04%, 96.93%, 100.12%, 98.25%, 99.07%, 97.03%, 100.05%, 97.48%, 99.36%, 98.42%, *RSD* 分别为 1.01%, 1.38%, 0.79%, 1.50%, 1.09%, 1.15%, 0.65%, 1.41%, 0.72%, 0.85% (*n*=9)。

2.5 高效液相色谱一测多评 (HPLC-QAMS) 相对校正因子的确定

2.5.1 相对校正因子 (*f*) 的计算

精密吸取“2.4.1”项 6 个系列线性工作溶液各 10 μL, 照“2.1”项色谱条件进样, 测定峰面积。以羟基红花黄色素 A 为含量内参物, 依公式相对校正因子 $f_k = A_k W_s / A_s W_k$ (A_k 和 W_k 分别为内参物的质量浓度和峰面积, A_s 和 W_s 依次代表其他待测成分的质量浓度和峰面积) 计算 *f*。结果缬草三酯、乙酰缬草三酯、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-*O*-β-芸香糖苷-6-*O*-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-*O*-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚的 *f* 分别为 0.937 9, 1.413 8, 1.934 8, 0.760 0, 1.078 9, 0.841 9, 2.578 5, 0.586 8 和 0.666 8, 显示 *RSD* 均小于 2.0%, 表明建立的 *f* 可用于复方牙痛酊的质量评价。

2.5.2 *f* 耐用性考察

精密吸取混合对照品溶液 10 μL, 照“2.1”项色谱条件测定峰面积, 分别考察了仪器 (Waters

Arc 型和 1100 型)、色谱柱 (Diamonsil C₁₈、Sepax BR C₁₈ 和 Phenomenex Luna C₁₈)、流速: (1.0 ± 0.2) mL · min⁻¹、柱温: (30 ± 5) °C 对 *f* 的影响。结果不同仪器与色谱柱时, *f* 的均值分别为 0.936 6, 1.414 0, 1.937 1, 0.758 7, 1.074 2, 0.843 6, 2.575 3, 0.581 6 和 0.662 9, 不同流速时, *f* 的均值分别为 0.938 7, 1.412 5, 1.931 2, 0.757 8, 1.073 9, 0.842 3, 2.579 8, 0.586 2 和 0.667 3, 不同柱温时, *f* 的均值分别为 0.937 7, 1.415 2, 1.933 8, 0.761 2, 1.074 3, 0.844 4, 2.563 2, 0.587 3 和 0.672 6, *RSD* 均小于 2.0%, 表明 *f* 耐用性良好。

2.5.3 色谱峰定位

记录“2.5.2”项下采用 3 支色谱柱在 2 个 HPLC 仪测定的色谱峰保留时间, 以羟基红花黄色素 A 为参照物, 采用相对保留时间 (*t*) 值法对待测成分色谱峰进行定位, 结果 *RSD* ≤ 1.65%, 表明采用 *t* 值法可以对目标化合物色谱峰进行准确定位, 见表 2。

2.6 含量测定

取按“2.2.2”项步骤制成的 15 批复方牙痛酊 (编号: S1~S15) 供试品溶液, 在上述色谱条件下测定峰面积, 加载“2.4.1”项回归方程, 运用外标法 (ESM) 计算 10 种成分含量; 以羟基红花黄色素 A 为参照物, 利用“2.5.1”项下公式采用 HPLC-QAMS 法计算另外 9 种成分的含量。以 *t*、*P* 值为统计量, 采用 SPSS 26.0 软件对 2 种方法所得各成分含量结果进行配对 *t* 检验, 结果显示两种方法所得结果差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见表 3。

表2 使用3支色谱柱在2个仪器上测定的*t*值结果 (*n*=6)

Table 2. *t* values determined from 2 instruments using 3 columns (*n*=6)

仪器	色谱柱	缬草三酯	乙酰缬草三酯	6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷	6-羟基山萘酚-3- <i>O</i> -β-芸香糖苷-6- <i>O</i> -β-葡萄糖苷	6-羟基山萘酚-3- <i>O</i> -β-葡萄糖苷	红花黄色素A	黄樟素乙二醇	指甲花醌	指甲花甲醚
Waters	Diamonsil C ₁₈	0.622 4	0.746 3	1.135 7	1.209 4	1.365 8	1.660 8	2.035 4	2.336 3	2.808 3
Arc	Sepax BR C ₁₈	0.628 5	0.754 7	1.147 6	1.215 8	1.374 2	1.669 2	2.046 2	2.341 2	2.816 9
	Phenomenex Luna C ₁₈	0.636 9	0.759 1	1.158 1	1.229 5	1.399 6	1.699 7	2.089 7	2.376 7	2.859 1
1100	Diamonsil C ₁₈	0.620 1	0.741 2	1.120 4	1.201 3	1.350 1	1.641 1	2.002 9	2.314 6	2.780 2
	Sepax BR C ₁₈	0.623 8	0.750 9	1.148 2	1.214 2	1.366 2	1.657 4	2.032 6	2.374 9	2.819 7
	Phenomenex Luna C ₁₈	0.635 1	0.758 5	1.156 9	1.228 7	1.397 5	1.695 3	2.087 5	2.336 3	2.856 4
平均值		0.627 8	0.751 8	1.144 5	1.216 5	1.375 6	1.670 6	2.049 1	2.348 7	2.823 4
<i>RSD</i> (%)		1.11	0.94	1.25	0.90	1.41	1.37	1.65	1.14	0.97

表3 复方牙痛酊中10种成分含量测定结果 (n=3, mg · mL⁻¹)
Table 3. Contents of 10 components in compound Yatong tincture (n=3, mg · mL⁻¹)

编号	羟基红花黄色素A	缬草三酯		6-羟基山萘酚-乙酐缬草三酯		3,6-双氧-葡萄糖苷		6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖		6-羟基山萘酚-酚-3-O-β-葡萄糖苷		红花黄色素A		黄樟素乙二醇		指甲花醌		指甲花甲醚	
		ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.513	0.127	0.129	0.062	0.063	0.057	0.058	0.169	0.173	0.092	0.094	0.375	0.382	0.031	0.032	0.218	0.223	0.183	0.186
S2	0.565	0.148	0.150	0.069	0.070	0.064	0.065	0.173	0.177	0.094	0.096	0.332	0.336	0.034	0.035	0.096	0.098	0.195	0.198
S3	0.589	0.122	0.124	0.083	0.084	0.061	0.062	0.184	0.187	0.117	0.119	0.368	0.373	0.033	0.034	0.199	0.202	0.171	0.173
S4	0.471	0.135	0.137	0.078	0.079	0.066	0.067	0.188	0.193	0.105	0.107	0.355	0.360	0.038	0.037	0.231	0.236	0.18	0.183
S5	0.529	0.124	0.126	0.069	0.068	0.054	0.055	0.211	0.216	0.085	0.084	0.341	0.346	0.026	0.027	0.221	0.225	0.184	0.188
S6	0.500	0.131	0.134	0.092	0.093	0.058	0.059	0.180	0.182	0.123	0.125	0.377	0.382	0.032	0.033	0.176	0.179	0.16	0.162
S7	0.478	0.129	0.131	0.102	0.101	0.047	0.048	0.229	0.234	0.069	0.070	0.298	0.300	0.02	0.021	0.113	0.115	0.149	0.152
S8	0.498	0.097	0.095	0.085	0.086	0.048	0.049	0.223	0.228	0.071	0.072	0.310	0.314	0.022	0.021	0.121	0.123	0.153	0.156
S9	0.461	0.120	0.122	0.101	0.103	0.046	0.047	0.244	0.247	0.058	0.057	0.286	0.291	0.024	0.023	0.109	0.111	0.14	0.142
S10	0.443	0.116	0.119	0.089	0.090	0.049	0.048	0.238	0.24	0.062	0.063	0.279	0.285	0.017	0.018	0.101	0.099	0.145	0.148
S11	0.714	0.113	0.116	0.062	0.061	0.088	0.089	0.140	0.141	0.153	0.155	0.433	0.439	0.032	0.033	0.32	0.326	0.224	0.229
S12	0.696	0.112	0.114	0.053	0.052	0.081	0.082	0.145	0.148	0.158	0.161	0.454	0.459	0.024	0.025	0.311	0.317	0.238	0.243
S13	0.737	0.104	0.106	0.055	0.056	0.09	0.092	0.125	0.127	0.165	0.168	0.471	0.477	0.028	0.029	0.338	0.344	0.233	0.238
S14	0.66	0.104	0.102	0.100	0.101	0.078	0.079	0.231	0.235	0.142	0.144	0.470	0.479	0.018	0.019	0.35	0.355	0.239	0.243
S15	0.679	0.101	0.099	0.067	0.066	0.075	0.076	0.228	0.231	0.127	0.129	0.461	0.469	0.031	0.032	0.287	0.290	0.240	0.244
t检验		-0.260		-0.065		-0.169		-0.240		-0.115		-0.216		-0.259		-0.102		-0.248	
P		0.797		0.949		0.867		0.812		0.909		0.830		0.797		0.919		0.806	

2.7 化学计量学识别模式的建立

2.7.1 聚类分析 (cluster analysis, CA)

以表3中 HPLC-QAMS 法计算结果为分析变量, 利用欧氏距离为测度的平均联接 (组间) 法, 采用 SPSS 26.0 软件进行 CA, 得图2。结果显示, 当欧氏距离为 10 时, 15 批复方牙痛酊样品可以分 3 类, 一类为样品 S9、S10、S7 和 S8, 一类为样品 S1、S4、S5、S6、S3 和 S2, 其余样品为一类。

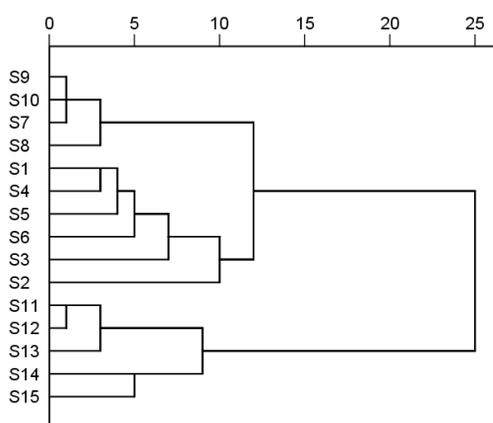


图2 15批复方牙痛酊样品CA结果图

Figure 2. CA results of 15 batches of compound Yatong tincture samples

2.7.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

以表3中 HPLC-QAMS 法测定结果为分析变量, 采用降维的方式, 将数据导入 SPSS 26.0 软件运行因子程序, 提取主成分, 显示成分矩阵见表4和表5。结果前2个主成分特征值均大于1, 其中主成分1的特征值为6.697, 方差贡献率为66.967%, 综合了乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素A、指甲花醌和指甲花甲醚等成分的信息; 主成分2的特征值为1.912, 方差贡献率为19.124%, 综合了缬草三酯和黄樟素乙二醇的信息。为进一步分析15批样品间的组间差距, 将表3中 HPLC-QAMS 法数据导入 Simca 14.1 软件绘制 PCA 模型, 见图3, 同样提取出2个主成分, 与PCA 互应。但样品间离散程度较大, 表明样品差异性较大。

表4 复方牙痛酊的主成分分析表

Table 4. Principal component analysis table of compound Yatong tincture

主成分	初始特征值			提取载荷平方和		
	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)	特征值	方差贡献率 (%)	累积方差贡献率 (%)
1	6.697	66.967	66.967	6.697	66.967	66.967
2	1.912	19.124	86.091	1.912	19.124	86.091

表5 因子载荷矩阵

Table 5. Component matrix

成分	主成分	
	1	2
缬草三酯	-0.364	0.829
乙酰缬草三酯	-0.721	-0.373
羟基红花黄色素A	0.947	-0.163
6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷	0.974	-0.005
6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷	-0.718	-0.548
6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷	0.958	0.011
红花黄色素A	0.953	-0.178
黄樟素乙二醇	0.359	0.813
指甲花醌	0.919	-0.210
指甲花甲醚	0.940	-0.151

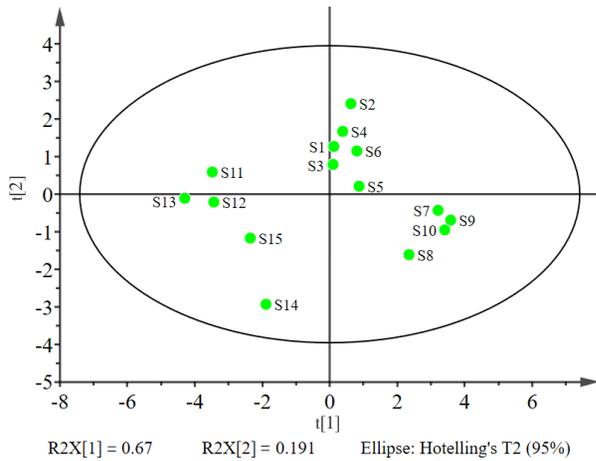


图3 15批复方牙痛酊PCA得分图

Figure 3. PCA score chart of 15 batches of compound Yatong tincture

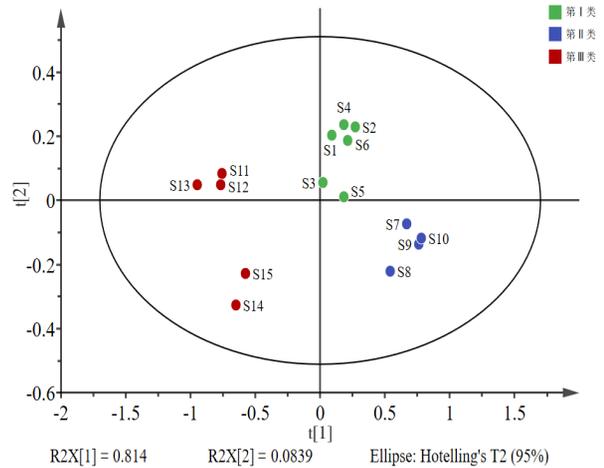


图4 15批复方牙痛酊的PLS-DA模型得分图

Figure 4. PLS-DA model of 15 batches of compound Yatong tincture

2.7.3 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares discrimination analysis, PLS-DA)

根据 15 批复方牙痛酊的含量, 选取表 3 中 HPLC-QAMS 法含量数据为分析变量, 15 批复方牙痛酊的 PLS-DA 得分图 (图 4) 显示 15 批样品批间质量差异较大, 该模型的 $R^2X=0.898$ 、 $R^2Y=0.754$ 、 $Q^2=0.672$, 说明模型具有良好的解释能力及预测能力, 且拟合度较好。经交叉验证 ($n=200$), R^2 与 Q^2 的差异小于 0.3, 表明所构建的 PLS-DA 可有效判别分析 15 批复方牙痛酊的质量差异。根据变量重要性投影 (VIP) 筛选出差异较大成分, 见图 5, 结果 $VIP > 1$ 的有 5 个成分 ($VIP_{\text{羟基红花黄色素 A}}=1.5340$ 、 $VIP_{\text{指甲花醌}}=1.2130$ 、 $VIP_{\text{缬草三酯}}=1.1100$ 、 $VIP_{\text{红花黄色素 A}}=1.0980$ 、 $VIP_{\text{6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷}}=1.0700$), 这 5 个成分可作为复方牙痛酊的质量差异性标志物。

2.7.4 EW-TOPSIS法分析

复方牙痛酊中的缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素 A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素 A、黄樟素乙二醇、指甲花醌和指甲花甲醚属于越大越优型指标。根据公式一对复方牙痛酊中 10 种成分 QAMS 法含量数据进行归一化处理。再将“2.7.3”项下各化学成分的 VIP 值作为各指标权重, 与归一化后的相应数据相乘得加权决策矩阵。以矩阵中各成分对应的最大值为最优方案 Z^+ , 最小值为最劣方案 Z^- , 故最

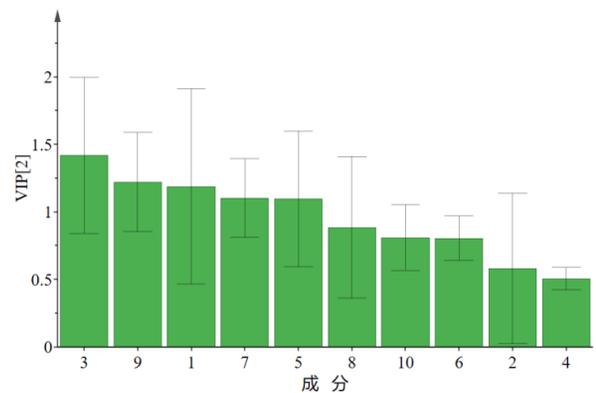


图5 PLS-DA模型中10个成分含量结果的的VIP值

Figure 5. VIP values of 10 components in the PLS-DA model

注: 1. 缬草三酯; 2. 乙酰缬草三酯; 3. 羟基红花黄色素A; 4. 6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷; 5. 6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷; 6. 6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷; 7. 红花黄色素A; 8. 黄樟素乙二醇; 9. 指甲花醌; 10. 指甲花甲醚

优方案 Z^+ 为 1.1100, 0.5760, 1.5340, 0.4980, 1.0700, 0.8110, 1.0980, 0.8450, 1.2130, 0.7990, 最劣方案 Z^- 均为 0。最后依据最优与最劣方案, 按公式一、公式二和最优解的欧氏贴近度公式三, 计算每批复方牙痛酊样品的 D_i^+ 、 D_i^- 值及 C_i , 结果见表 6, 具体公式如下:

$$\text{公式一} \quad D_i^+ = \sqrt{\sum_{j=1}^n (z_{ij} - z_j^+)^2}$$

$$\text{公式二} \quad D_i^- = \sqrt{\sum_{j=1}^n (z_{ij} - z_j^-)^2}$$

$$\text{公式三} \quad C_i = \frac{D_i^-}{D_i^+ + D_i^-} \times 100\%$$

表6 15批复方牙痛酊的EW-TOPSIS评价结果

Table 6. The results of EW-TOPSIS evaluation of 15 batches of compound Yatong tincture

编号	D_i^+	D_i^-	C_i	排名
S1	1.888 0	1.425 4	0.430 2	11
S2	1.990 9	1.686 9	0.458 7	8
S3	1.628 1	1.620 8	0.498 9	6
S4	1.890 3	1.668 3	0.468 8	7
S5	1.876 9	1.438 9	0.434 0	10
S6	1.910 5	1.531 1	0.444 9	9
S7	2.464 3	1.350 7	0.354 0	12
S8	2.573 6	1.060 2	0.291 8	15
S9	2.604 5	1.355 3	0.342 3	13
S10	2.746 0	1.199 3	0.304 0	14
S11	1.314 9	2.400 2	0.646 1	3
S12	1.424 5	2.326 6	0.620 2	5
S13	1.531 9	2.577 6	0.627 2	4
S14	1.343 2	2.523 9	0.652 7	2
S15	1.267 1	2.391 5	0.653 7	1

3 讨论

3.1 HPLC流动相的选择

查阅相关文献,本试验考察了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.4%磷酸溶液、乙腈-0.01%乙酸溶液等系统对复方牙痛酊中的缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花黄色素A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚的响应值及分离效果,同时兼顾流动相体系pH值对色谱柱的耐受性。结果显示,以乙腈-0.4%磷酸溶液为流动相时,基线平稳,10种待测成分的检验用时、峰形及峰纯度最优,流动相体系符合色谱柱pH值适用范围要求。

3.2 供试品溶液制备

在制备供试品溶液时,首先对提取溶剂(25%甲醇、50%甲醇、70%甲醇和100%甲醇)进行了优化筛选,结果发现70%甲醇提取时,复方牙痛酊中的缬草三酯、乙酰缬草三酯、羟基红花黄色素A、6-羟基山萘酚-3,6-双氧-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷、6-羟基山萘酚-3-O-β-葡萄糖苷、红花

黄色素A、黄樟素乙二醇、指甲花醌、指甲花甲醚提取率较高,峰面积的和最大。考虑到该制剂为液体制剂,在生产时已进行了提取,采用直接稀释摇匀的方法对比超声和加热回流,结果发现70%甲醇直接稀释摇匀时,色谱图中10种成分的色谱峰面积最大,杂质最少,同时该方法简单且环保经济,故以70%甲醇稀释摇匀为复方牙痛酊供试品提取方式。

3.3 质量评价结果分析

本试验基于中药质量标志物和中医配伍组方理论,采用高效液相色谱-一测多评法对复方牙痛酊中10种化学成分进行了同时检测,方法操作便捷、结果准确可靠。从15批复方牙痛酊中10个成分含量结果来看,各指标成分含量均存在一定批间差异,表明建立复方牙痛酊多指标成分同时定量控制方法对稳定其产品质量具有重要意义,同时一测多评法有效降低了检验成本,推动了该方法的普及应用。CA和PCA评价结果显示15批复方牙痛酊样品样品聚为3类,同一生产阶段样品聚为一类,表明同一生产阶段的复方牙痛酊质量较为稳定,不同生产阶段样品存在一定的质量差异,有助于生产企业结合原药材种属、产地来源以及原药材批次,以及制剂生产过程质量控制查找引起质量差异的主要因素,为进一步稳定产

品质量提供了方法；PLS-DA 结果显示羟基红花黄色素 A、指甲花醌、缬草三酯、红花黄色素 A 和 6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷对复方牙痛酊质量影响较大，可能是影响复方牙痛酊产品质量的差异标志物。现代研究^[20]表明红花黄色素 A 具有明显的扩张血管、改善心肌供血、抑制二磷酸腺苷诱导家兔血小板聚集以及抗炎等多种药理作用；羟基红花黄色素 A 能够抑制丝裂原活化蛋白激酶 /p38/ 诱导型一氧化氮合酶通道，减少一氧化氮的合成和释放，显著减少醋酸所致的小鼠扭体数，提高热板所致的小鼠疼痛阈值，具有明显的抗炎镇痛作用^[21]；羟基红花黄色素 A、红花黄色素 A 和 6-羟基山萘酚-3-O-β-芸香糖苷-6-O-β-葡萄糖苷等黄酮及黄酮苷类为红花主要生物活性组分，在复方牙痛酊中发挥活血止痛作用。指甲花醌为凤仙花主要活性成分，具有明显的抗菌和抗氧化活性，缬草三酯具有镇静止痛作用^[22]。EW-TOPSIS 法通过对 10 × 15 的矩阵数据进行合理赋权，基于赋权评价，以距离理想化目标的程度为准则对其进行排序，避免了人为因素影响，同时对多指标多数据进行处理，可更客观科学地评判复方牙痛酊的质量优劣，为更加全面地评价该产品质量，不断提升其质量控制手段提供了参考依据。

本试验采用 HPLC-QAMS 法对复方牙痛酊样品中缬草三酯等 10 个成分含量进行了同时检测，并联合 CA、PCA、PLS-DA 及 EW-TOPSIS 对其检测结果进行综合分析，所建立的方法操作便捷、结果准确，可用于复方牙痛酊的综合质量评价。

参考文献

- 1 国家药品监督管理局. 国家药品标准 WS-10589 (ZD-0589) -2002-2012Z[S]. 2012.
- 2 汪建君, 李玲玲, 黄惠琼. GC 法同时测定复方牙痛酊中樟脑和乙酸龙脑酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(1): 129-132. [Wang JJ, Li LL, Huang HQ. Simultaneous determination of camphor and borneol acetate in compound Yatong tincture by GC[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 35(1): 129-132.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2015.01.023.
- 3 程寿峰, 张明时. 填充柱气相色谱法测定复方牙痛酊中甲醇含量[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2012, 30(2): 68-70. [Cheng SF, Zhang MS. Quantitative determination of methanol in Fufang-yatongding by packed column gas chromatography[J]. Journal of Guizhou Normal University (Natural Sciences), 2012, 30(2): 68-70.] DOI: 10.16614/j.cnki.issn1004-5570.2012.02.009.
- 4 于洋, 李军, 李宝国, 等. 化学计量学在中药质量控制研究中的应用[J]. 中成药, 2018, 40(5): 1139-1142. [Yu Y, Li J, Li BG, et al. Application of chemometrics in quality control of traditional Chinese medicine[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2018, 40(5): 1139-1142.] DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.05.028.
- 5 何佳, 黄文康, 马相锋, 等. 基于主成分分析与 PLS-DA 分析研究浙麦冬道地性与等级评价标准[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(4): 285-292. [He J, Huang WK, Ma XF, et al. Geoherbalism and grand evaluation of Zhejiang Ophiopogon japonicas based on PCA and PLS-DA[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2021, 56(4): 285-292.] DOI: 10.11669/cpj.2021.04.005.
- 6 张智慧, 王悦, 张学兰, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与多元统计分析的生地黄与熟地黄差异评价[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(6): 1383-1386. [Zhang ZH, Wang Y, Zhang XL, et al. The difference evaluation of raw and wine-steaming Rehmannia glutinosa based on HPLC fingerprint and multivariate statistical analysis[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2021, 32(6): 1383-1386.] DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.06.29.
- 7 付洋, 程盛勇, 郁林娜, 等. 一测多评法测定蜘蛛香中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1666-1672. [Fu Y, Cheng SY, Yu LN, et al. Simultaneous determination of nine components in Valeriana jatamansi by QAMS[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(9): 1666-1672.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2019.09.17.
- 8 程盛勇, 付洋, 郁林娜, 等. 蜘蛛香 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2019, 42(5): 1080-1084. [Cheng SY, Fu Y, Yu LN, et al. Study on fingerprint of Valeriana jatamansi by UPLC[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2019, 42(5): 1080-1084.] DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.05.026.
- 9 舒波, 刘福. HPLC 法测定醒脾养儿颗粒中熊果苷, 槲皮苷, 缬草三酯和乙酰缬草三酯[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(4): 584-587. [Shu B, Liu F. Determination of arbutin, quercitrin, valepotriate and acevaltrate in Xingpi Yang'er granules by HPLC[J]. Drugs & Clinic, 2017, 32(4):

- 584–587.] DOI: 10.7501/j.issn.1674–5515.2017.04.007.
- 10 侯文慧, 刘勇, 王春国, 等. HPLC 法同时测定蜘蛛香药材中缬草三酯类化合物及其降解产物的含量 [J]. 世界科学技术 – 中医药现代化, 2014, 16(12): 2658–2663. [Hou WH, Liu Y, Wang CG, et al. Determination of valepotriates and their degradation products in *Valeriana Jatamansi Jones* by HPLC[J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2014, 16(12): 2658–2663.] DOI: 10.11842/wst.2014.12.024.
 - 11 李美阳. HPLC 法测定不同采集时期的北缬草中生理活性成分含量 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(2): 604–605. [Li MY. Active ingredients content in *Valeriana fauriei* at different acquisition periods by HPLC method[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(2): 604–605.] DOI: 10.13989/j.cnki.0517–6611.2013.02.131.
 - 12 刘晶晶, 李玉华, 安文源, 等. HPLC 法测定蒙成药哈日阿 – 布日 – 16 中羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 中国药品标准, 2022, 23(1): 35–39. [Liu JJ, Li YH, An WY, et al. Determination of hydroxysafflor yellow Ain Mongolian Harla–Buri–16 by HPLC[J]. Drug Standards of China, 2022, 23(1): 35–39.] DOI: 10.19778/j.chp.2022.01.008.
 - 13 兰艺凤, 周璐, 张立伟. HPLC 法同时测定红花中 5 种黄酮成分 [J]. 食品科学, 2011, 32(12): 283–286. [Lan YF, Zhou L, Zhang LW. Simultaneous HPLC determination of five flavonoid components in *Carthamus tinctorius L.* flowers[J]. Food Science, 2011, 32(12): 283–286.]
 - 14 何婷, 李柯翔, 李志红, 等. HPLC 同时测定红花药材中 4 种化学成分含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(4): 79–82. [He T, Li KA, Ji ZH, et al. Simultaneous determination of four chemical components in *Carthamus tinctorius L.* by HPLC[J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2017, 24(4): 79–82.] DOI: 10.3969/j.issn.1005–5304.2017.04.020.
 - 15 刘德军, 贺玲, 樊苗苗, 等. HPLC–QAMS 法同时测定前列平胶囊中 7 种成分的含量 [J]. 实用药物与临床, 2020, 23(12): 1119–1125. [Liu DJ, He L, Fan MM, et al. Quantitative determination of seven components in Qianlieping capsule by HPLC–QAMS[J]. Practical Pharmacy And Clinical Remedies, 2020, 23(12): 1119–1125.] DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.202012013.
 - 16 王玉娟, 崔苏镇, 陶利, 等. HPLC 梯度洗脱法同时测定舒心降脂片中 8 种成分的含量 [J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2039–2042. [Wang YJ, Cui SZ, Tao L, et al. Simultaneous determination of eight constituents in Shuxin Jiangzhi tablets by HPLC gradient elution method[J]. China Pharmacist, 2020, 23(10): 2039–2042.] DOI: 10.3969/j.issn.1008–049X.2020.10.039.
 - 17 陈桃香, 吴海燕, 李春宁, 等. 苗药凤仙花的提取工艺优选及质量标准的研究 [J]. 贵州科学, 2022, 40(2): 34–38. [Chen TX, Wu HY, Li CN, et al. Study on the optimum extraction process and quality standard of Miao medicine *impatiens balsamina*[J]. Guizhou Science, 2022, 40(2): 34–38.] DOI: 10.3969/j.issn.1003–6563.2022.02.008.
 - 18 吴海燕, 李春宁, 胡成刚, 等. 黔产凤仙花中 2- 甲氧基 – 1,4- 萘醌的含量测定 [J]. 贵州科学, 2020, 38(4): 16–19. [Wu HY, Li CN, Hu CG, et al. Determination of the content of 2-methoxy–1,4–naphthoquinone in *Impatiens balsamina* from Guizhou[J]. Guizhou Science, 2020, 38(4): 16–19.] DOI: 10.3969/j.issn.1003–6563.2020.04.004.
 - 19 王芳, 王宝华, 丁磊, 等. 凤仙花的指纹图谱研究及 2 种 1,4- 萘醌成分的含量测定 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33(1): 24–28. [Wang F, Wang BH, Ding L, et al. Establishment of fingerprints and simultaneous determination 2 kinds of 1,4–naphthoquinone in *Impatiens balsamina L.*[J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2018, 33(1): 24–28.] DOI: 10.3969/j.issn.1004–2407.2018.01.006.
 - 20 李秋宇. 红花黄色素 A 对脓毒症大鼠血清细胞因子的调控和凝血机能的影响 [D]. 昆明: 云南中医学院, 2015.
 - 21 李响, 俱蓉, 李硕. 红花化学成分药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 928–939. [Li X, Ju R, Li S. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *carthamus tinctorius* and predictive analysis on quality markers[J]. Mod Chin Med, 2021, 23(5): 928–939.] DOI: 10.13313/j.issn.1673–4890.20200321001.
 - 22 韩基红, 富小珺. 缬草的药用价值研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(24): 28–29. [Han JH, Fu XJ. Research progress on medicinal value of valerian[J]. World Latest Medicine Information, 2017, 17(24): 28–29.] DOI: 10.3969/j.issn.1671–3141.2017.24.012.

收稿日期: 2022 年 09 月 14 日 修回日期: 2023 年 02 月 16 日
 本文编辑: 周璐敏 钟巧妮